

IL-2増殖シグナル伝達におけるJak1キナーゼの不要性

著者	樋口 雅也
号	1334
発行年	1997
URL	http://hdl.handle.net/10097/21381

氏 名（本籍）	樋 口 まさや
学 位 の 種 類	博 士 （医 学）
学 位 記 番 号	医 博 第 1 3 3 4 号
学位授与年月日	平 成 9 年 3 月 25 日
学位授与の条件	学位規則第4条第1項該当
研 究 科 専 攻	東北大学大学院医学系研究科 （博士課程）病理学系専攻
学 位 論 文 題 目	IL-2 増殖シグナル伝達における Jak1 キナーゼの 不要性

（主 査）

論文審査委員	教授 菅 村 和 夫	教授 岡 本 宏
	教授 佐 竹 正 延	

論文内容要旨

【研究目的】

インターロイキン2受容体 (IL-2R) は IL-2R β 鎖および γ 鎖を介してシグナルを伝えるが、 β 鎖には Jak1, γ 鎖には Jak3 チロシンキナーゼが会合しており、IL-2 刺激によりこれらのキナーゼが活性化されることによりシグナルが伝えられる。本研究では、Jak1 と IL-2R β 鎖との会合に必須な部位を同定し、さらに Jak1, Jak3 の活性化のメカニズムおよびその細胞増殖における重要性を解析した。

【研究結果】

Jak1 は IL-2 だけでなく IL-2R γ 鎖を受容体サブユニットとして共有する IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 刺激によっても活性化される。このことから、Jak1 は IL-4, IL-7, IL-9 の各受容体の α 鎖に会合していることが予想されたため、各受容体の α 鎖と Jak1 の会合を免疫沈降法により解析した。PHA で刺激したヒト末梢血 T 細胞を可溶化し抗 IL-4R α , IL-7R α 抗体で、またヒト IL-9R α 鎖を導入したマウス T 細胞株 TS1h9RA3 を抗 IL-9R α 鎖抗体で免疫沈降し、抗 Jak1 抗体によるウエスタンブロットを行ったところ、各受容体の α 鎖と Jak1 の共沈、すなわち IL-4R, IL-7R, IL-9R の α 鎖と Jak1 の会合が、IL-2R β 鎖と同様に確認された。

これらのレセプター間では box 1 とよばれる領域、特にプロリン-X-プロリンの配列がよく保存されている。box 1 領域とはサイトカイン受容体間で広く保存され、シグナル伝達に重要であるとされている領域である。これらのことから、この領域が Jak1 と各受容体との会合に重要であると考え、IL-2R β 鎖の box 1 領域の2つのプロリン残基をセリンに設置した変異体を作製、これを IL-2R γ 鎖のみを発現するヒト T 細胞株 MOLT-4 に導入し以下の解析を行った。

まず変異 β 鎖と Jak1 の会合を免疫沈降法により解析した。野生型あるいは変異型 IL-2R β 鎖を発現する MOLT-4 細胞を可溶化後、抗 IL-2R β 鎖抗体で免疫沈降し抗 Jak1 抗体を用いたウエスタンブロットを行ったところ、変異 IL-2R β 鎖と Jak1 の会合は全く認められなかった。つまり、box 1 領域のプロリン残基が Jak1 の会合に重要であることが明らかとなった。

次に Jak1, Jak3 のチロシンリン酸化を検討した。各細胞を 10nM の IL-2 で 5 分間刺激後可溶化し抗 Jak1 および Jak3 抗体で免疫沈降、抗リン酸化チロシン抗体によるウエスタンブロットを行った。その結果、Jak1 の活性化は野生型でのみ見られ変異型では検出感度以下であったが、Jak3 の活性化は野生型および変異型の両方の細胞で同程度に強く認められた。さらに Jak の直接の基質であると考えられている Stat5 の活性化を検討したところ、IL-2 刺激によるチロシ

ンリン酸化および DNA 結合能とも両方の細胞で同程度に認められた。

続いてこれらの細胞の IL-2 刺激による細胞増殖を ^3H チミジン取り込みにより検討したところ、野生型および変異型の細胞で同程度に IL-2 刺激による細胞増殖が認められた。

以上の結果より MOLT-4 細胞においては、Jak1 の活性化は Jak3, Stat5 の活性化に必須ではなく、IL-2 による細胞増殖シグナル伝達においては Jak1 ではなく Jak3 の活性化が重要であることが明らかとなった。

審 査 結 果 の 要 旨

インターロイキン2受容体 (IL-2R) は IL-2R β 鎖および γ 鎖を介してシグナルを伝えるが、 β 鎖には Jak1, γ 鎖には Jak3 チロシンキナーゼが会合しており, IL-2 刺激によりこれらのキナーゼが活性化されることによりシグナルが伝えられる。本論文は, Jak1 と IL-2R β 鎖との会合に β 鎖の box1 領域が必須であること, さらに Jak1 の活性化は, Jak3 と Stat5 の活性化および細胞増殖シグナル伝達には必須ではないことを証明したものである。

Jak1 は IL-2 だけでなく IL-2R γ 鎖を受容体として共有する IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 刺激によっても活性化されることから, 本論文ではまず, Jak1 と IL-4, IL-7, IL-9 の各受容体の α 鎖との会合を免疫沈降法により解析している。その結果, PHA で刺激したヒト末梢血 T 細胞およびヒト IL-9R α 鎖導入マウス T 細胞株 TS1h9RA3 において, 各受容体の α 鎖と Jak1 の共沈, すなわち IL-4R, IL-7R, IL-9R の α 鎖と Jak1 の会合が, IL-2R β 鎖と同様に確認された。これらのレセプター間では box1 とよばれる領域, 特にプロリン-X-プロリンの配列がよく保存されている。そこで, この領域が Jak1 と各受容体との会合に重要であると考え, IL-2R β 鎖の box1 領域の 2 つのプロリン残基をセリンに置換した変異体を作製し, これを IL-2R γ 鎖のみを発現するヒト T 細胞株 MOLT-4 に導入し以下の解析を行った。まず変異 β 鎖と Jak1 の会合を免疫沈降法により解析した結果, 変異 IL-2R β 鎖と Jak1 の会合は全く認められなかった。つまり, box1 領域のプロリン残基が Jak1 の会合に重要であることが明らかとなった。次に Jak1, Jak3 の IL-2 刺激によるチロシンリン酸化を, 抗リン酸化チロシン抗体によるウエスタンブロットにより検討したところ, Jak1 の活性化は野生型でのみみられ, 変異型では検出感度以下であった。しかし, Jak3 の活性化は野生型および変異型の両方の細胞で同程度に強く認められ, さらに Jak の直接の基質であると考えられている Stat5 の活性化も両方の細胞で同程度に認められた。続いてこれらの細胞の IL-2 刺激による細胞増殖を ^3H チミジン取り込みにより検討したところ, 野生型および変異型の細胞で同程度に IL-2 刺激による細胞増殖が認められた。以上より MOLT-4 細胞においては, Jak1 の活性化は Jak3, Stat5 の活性化に必須ではなく, IL-2 による細胞増殖シグナル伝達においては Jak1 ではなく Jak3 の活性化が重要であることが明らかとなった。

本論文は IL-2R β 鎖と Jak1 との会合に必須な部位を同定し, さらに Jak1 と Jak3 の活性化のメカニズムに関して, 新たな知見を提出した。このことはサイトカイン受容体からのシグナル伝達機構の解明にとって重要な発見である。本論文は博士号授与に値する研究とみなす。